



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Estudio morfohistológico y farmacológico de *Lepidium meyenii* Walpers "Maca"

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Manuel Jesús MARÍN BRAVO

ASESOR

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

Lima, Perú

2002



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Marín M. Estudio morfohistológico y farmacológico de *Lepidium meyenii* Walpers "Maca" [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2002.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**

Siendo la 1:00 p.m. del día viernes 13 de diciembre del 2002, en el Salón de Grados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis, presidido por la Dra. Eleucy Pérez Tuesta e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Bonilla Rivera (Asesor), Dr. Jorge Arroyo Acevedo, Mg. Arilmi Gorriti Gutiérrez y el Mg. Luis Rojas Ríos, se reunieron para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: "**ESTUDIO MORFOHISTOLÓGICO Y FARMACOLÓGICO DE *Lepidium meyenii* Walpers (MACA)**", del Bachiller en Ciencias Biológicas **MANUEL JESÚS MARÍN BRAVO**, de la Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Sobresaliente

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga, que se le otorgue al Bachiller en Ciencias Biológicas **MANUEL JESÚS MARÍN BRAVO**, el Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos.

Siendo las *14:30* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *14:40* hrs. del día viernes 13 de diciembre del 2002.

Dra. Eleucy Pérez Tuesta (P.P., D.E.)
Presidenta

Dr. Pablo Bonilla Rivera (P.P, T.C.)
Miembro

Dr. Jorge Arroyo Acevedo (P.P., D.E.)
Miembro

Mg. Arilmi Gorriti Gutiérrez (P.P, T.C.)
Miembro

Mg. Luis Rojas Ríos (P.Asoc., T.P.)
Miembro

Observaciones:

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYTEC, por la subvención del proyecto de tesis.

A los Drs. Pablo Bonilla y Jorge Acevedo, por su asesoría y valioso apoyo en la realización de la parte experimental de la tesis.

Asimismo, el autor desea expresar su agradecimiento a:

Eleucy Pérez, Teodoro Amorotto, Martha Valdivia, Bertha Jurado, Betty Millán, Mery Suni, Miguel Félix, Domingo Iparraguirre, Jasmín Opisso y,

A la plana Docente de la Maestría de Recursos Vegetales y Terapéuticos, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1. Generalidades	7
1.1.1. Estudios Histológicos	9
1.1.2. Estudios Fitoquímicos	9
1.1.3. Estudios Farmacológicos	10
I.2. Hipótesis	12
I.3. Objetivos	12
I.4. Metas Específicas	12
II. PARTE EXPERIMENTAL	13
II.1. Materiales y Equipos	13
II.1.1. Material Biológico	13
II.1.2. Reactivos Químicos y Material de Vidrio	13
II.1.3. Equipos e Instrumentos	14
II.2. Metodología	14
II.2.1. Estudio Morfoanatómico	14
II.2.2. Extracción de Lípidos Totales	15
II.2.3. Estudio Farmacológico	16
III. RESULTADOS	18
III.3. Estudio Morfoanatómico	18
III.4. Estudio Farmacológico	20
IV. DISCUSIÓN	21
V. CONCLUSIONES	28
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
VII. ANEXO	34

RESUMEN

Se presenta el estudio Morfohistológico y Farmacológico de *Lepidium meyenii* Walpers (maca), enfocado principalmente en la caracterización histológica del órgano reservante subterráneo y el ensayo farmacológico de las fracciones lipídicas aisladas a partir del extracto hexánico del mismo, sobre el aparato reproductor de ratones hembras.

Los diferentes estudios realizados hasta la fecha muestran carencia en la información botánica referente a los detalles histológicos de la naturaleza anatómica del órgano reservante; por otro lado existen numerosos reportes de la variada composición en metabolitos secundarios presentes en la planta, sin embargo no ha sido demostrado que tipo de sustancias están implicadas en el efecto terapéutico de estimulante de la reproducción humana asociado a esta planta. Asimismo, el órgano reservante se caracteriza por su importante contenido en ácidos grasos y fitoesteroles, ambos tipos de sustancias asociadas a los procesos reproductivos.

El presente estudio se realizó con variedades amarillas de maca procedentes de los Andes Centrales (Puna de Junín) y comprendió el estudio morfoanatómico del órgano reservante y parte aérea de la planta y el ensayo farmacológico de fracciones aisladas en ratones hembras. El estudio morfohistológico se realizó, empleando la técnica de inclusión en parafina, con tinción y montaje permanente de los cortes seriados a micrótomos e incluyó cortes a mano alzada de muestras fijadas en FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol). El ensayo farmacológico comprendió primero la obtención de un extracto hexánico a partir del material seco y luego la saponificación del mismo para el fraccionamiento en sus componentes principales, ácidos grasos y esteroides totales. Posteriormente se administraron por vía oral las diferentes fracciones aisladas en ratones

hembras en dos niveles de dosis, por un período de 16 días, al termino de los cuales se procedió al sacrificio y disección de los animales para la extracción de los ovarios, tomando registro de sus pesos, para luego fijarlos en formaldehído neutro 5%.

Los resultados del estudio Morfohistológico muestran en el órgano reservante las características de una región de transición entre la zona radical, de una estructura secundaria lignificada y el tallo primario reducido, con el desarrollo de una amplia zona medular y una característica actividad cambial anómala en la zona cortical que contribuye al engrosamiento del órgano. Así mismo, entre los detalles histológicos adicionales reportados para esta planta están el desarrollo de una cubierta suberificada de células corticales primarias en vez de peridermis en el órgano reservante y la presencia de pelos cónicos unicelulares en las hojas.

El ensayo farmacológico muestra un significativo efecto de la fracción esteroides totales sobre los ovarios de los animales evaluados, a nivel de la formación de los folículos secundarios. A los 16 días de tratamiento la dosis de 100 mg / kg muestra un claro efecto estrogénico. Asimismo, el extracto hexánico presentó un fuerte efecto antiestrogénico, disminuyendo el peso y el diámetro de los ovarios y folículos secundarios a los 8 y 16 días. Este efecto lo presenta también la fracción de ácidos grasos totales, en dosis de 100 mg / kg a los 16 días de tratamiento. El ensayo del extracto etanólico de maca, proveniente del residuo del extracto hexánico, no presentó efecto a nivel del sistema reproductor de los animales estudiados.

Se concluye que el órgano reservante de la maca tiene las características de una región de transición entre la raíz y el tallo y presenta además una importante actividad cambial secundaria responsable del engrosamiento del órgano. Así mismo la fracción de esteroides totales presenta un efecto estrogénico en el aparato reproductor de los animales estudiados mientras que el extracto hexánico presenta un fuerte efecto antiestrogénico en los mismos

ABSTRACT

The morphohistological and pharmacological study of *Lepidium meyenii* Walpers (maca) is focused mainly on the histological characterization of the underground storage organ and the pharmacological assays of the lipidic fractions isolated from the hexanic extract of this organ on the reproductive apparatus of female mice.

The different studies up to day show a lack in the botanical information regarding the histological details of the anatomical nature of the storage organ; on the other hand there are numerous reports of the varied composition in secondary metabolites present in the plant, however it has not been demonstrated what type of substances are implied in the therapeutic effect of stimulant of the human reproduction associated to this plant. Also, the storage organ is characterized by its important content in fatty acids and phytoesters, both types of substances associated to the reproductive processes.

The present study was carried out with yellow varieties from the Peruvian Puna (Junín) and it comprised the morphohistological study of the storage organ and aerial part of the plant and the pharmacological assays of fractions isolated in female mice. The morphohistological study was carried out, using the inclusion in paraffin technique, stained and mounted in balsam of the microtoming serial cuts and it included cuts by hand of samples fixed in FAA (formaldehyde, acetic glacial acid and ethanol). The pharmacological assay first comprised the obtainment of an hexanic extract starting from the dry material and then the saponification of the same one for the fractionating in its main components, fatty acids and total sterols. Later on they were assayed for via oral the different fractions isolated in female mice in two dose levels, for a period of 16 days, at the end of which it proceeded to the sacrifice and dissection of the animals for the extraction of the ovaries, taking registration of their weights, afterwards fixing them with neutral formaldehyde 5%.

The results of the morphohistological study show in the storage organ the characteristics of a transitional region among the root of a lignified structure and a reduced primary stem, with the development of a wide medullary area and a characteristic secondary cambial activity in the cortical area that contributes to the thickening of the organ. Likewise, among the additional histological details reported for this plant it is the development of a suberized primary cortical cells instead of periderm in the storage organ and conical unicellular trichomes in the surface of the leaves.

The pharmacological assays shows a significant effect of the total fraction sterols on the ovaries of the evaluated animals, at level of the formation of the secondary follicles. At the 16 days of treatment the dose of 100 mg / kg shows a clear estrogenic effect. Also, the hexanic extract presents a strong antiestrogenic effect, diminishing the weight and the diameter of the ovaries and secondary follicles at the 8 and 16 days. Also this effect it presented the total fatty acids fraction in dose of 100 mg / kg at the 16 days of treatment. The assay of the ethanolic extract, from the residual of the hexanic extract, presented no effect in the reproductive system of the studied animals.

its concludes that the storage organ of maca has the characteristics of a transitional region between the root and the stem and it also presents an important secondary cambial activity responsible for the thickening of the organ. Likewise the total sterols fraction presents an estrogenic effect in the reproductive apparatus of the studied animals while the hexanic extract presents a strong antiestrogenic effect in the same ones

I. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

La Maca, *Lepidium meyenii* Walpers, es una especie nativa de los Andes Peruanos que se cultiva principalmente en la zona de la meseta de Bombón, en el Departamento de Junín, entre los 3,700 y 4,500 msnm, región que presenta un clima agreste y temperaturas extremas de -10° C°. Conocida y empleada desde los tiempos precolombinos principalmente como una planta medicinal y/o alimenticia, la medicina tradicional peruana hace mención de sus principales propiedades como estimulante de la reproducción y energizante o revitalizadora. (Antunez de Mayolo, 1977; León, 1964; Tovar, 2001).

Los diversos estudios experimentales realizados con esta planta han corroborado en parte las diversas bondades que se le atribuye. Desde los primeros estudios fitoquímicos realizados por Chacón (1997) y Baquerizo (1968) en los que se revelan los primeros metabolitos secundarios y el alto contenido en minerales y carbohidratos, esta planta ha sido objeto de diversos estudios en los últimos años, constituyendola en un verdadero redescubrimiento de la maca.

Numerosos trabajos han descrito ampliamente la morfología externa de esta planta (León, 1964; Chacón, 1997,1990; Obregón, 1998). La maca se describe morfológicamente como una planta típica de la puna, de porte arrosetado que presenta una corona de hojas

basales que surgen por encima de un eje carnosos en el suelo. Estas hojas son pinnatífidas, de pecíolos aplanados y presentan generalmente dimorfismo en su desarrollo. El tallo principal se presenta muy reducido y más bien se desarrollan ramas secundarias en su ciclo reproductivo. Las flores son muy pequeñas y blanquecinas, están dispuestas en inflorescencias racimosas que se desarrollan en el período reproductivo. El fruto es una silícula que porta una semilla parda de forma ovoide de aproximadamente 2 mm de longitud.

La maca es considerada un cultivo bianual, presentando una fase vegetativa en la que se produce el crecimiento y expansión del órgano de reserva y una fase reproductiva, caracterizada por la producción de flores y frutos. Sin embargo, durante los años de condiciones climáticas favorables (ausencia de heladas y abundante humedad) las plantas pueden completar su ciclo reproductivo en un año (Quiroz and Aliaga, 1997).

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchior en 1964, la clasificación botánica de la maca es la siguiente:

División:	ANGIOSPERMAE
Clase:	DICOTYLEDONEAE
Subclase:	ARCHICHLAMIDEAE
Orden:	PAPAVERALES
Familia:	BRASSICACEAE
Género:	<i>Lepidium</i>
Especie:	<i>Lepidium meyenii</i> Walpers ¹
Nombre vulgar:	Maca, macamaca, maini

1.1.1. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Los diferentes autores al referirse al órgano reservante de la planta responsable de las propiedades terapéuticas, lo han descrito unos como hipocótilo (León, 1964; Aliaga, 1995; Quiroz and Aliaga, 1997; Canales *et al.*, 1993) y otros como raíz (Baquerizo, 1968; Lama

¹ Actualmente se considera también, la determinación de *Lepidium peruvianum*, pero no se encuentra oficializada, conservándose la denominación de *Lepidium meyenii* Walpers. Ver discusión.

et al., 1994; Obregón, 1998). Probablemente ambos términos son discutibles dado que el primero sólo es válido cuando se emplea en los primeros estadios de una plántula, mientras que en el segundo no tiene en consideración el porte arrosado de la planta adulta y por lo tanto que posee una región de tallo muy reducida en unión con la raíz. El problema lejos de ser resuelto ha sido simplificado al punto de ser considerado agrónomicamente como una raíz reservante (Aliaga, 1995; Chacón, 1997; Obregón, 1998). Los trabajos publicados sobre el tema no muestran los detalles histológicos que evidencien claramente la naturaleza anatómica del órgano reservante. El importante aporte realizado por León (1964) en el que da cuenta de características peculiares encontradas en la maca en cuanto a su estructura interna no ha sido posteriormente revisada. Asimismo, Metcalfe y Chalk (1950) en la revisión de los aspectos anatómicos de la familia Cruciferae (Brassicaceae) revelan importantes características del género *Lepidium* que no han sido verificados para *Lepidium meyenii* Walpers. Los estudios botánicos realizados (Obregón, 1998; Chacón, 1997; León, 1964), carecen además de una adecuada evidencia e interpretación histológica de los tejidos, por lo que se requiere completar los estudios sobre la estructura interna de la planta.

1.1.2. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS

Aparte de los elementos primarios hallados, los estudios fitoquímicos de la maca se han caracterizado por la variedad de componentes secundarios. Los principales son alcaloides, aminoácidos, aminos secundarias alifáticas y aminos terciarias, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y xantófilas, esteroides, saponinas, glicósidos, tioglucósidos y ácidos grasos (Chacón, 1997; Dini *et al.*, 1994; Garró *et al.*, 1993; Yllesca, 1994; Obregón, 1998; Zheng *et al.*, 2000). En estos estudios se han empleado diversas técnicas y sólo se han identificado positivamente isotiocianato de bencilo y p-metoxibencilo (Johns, 1981; Zheng *et al.*, 2000; Genyi *et al.*, 2001), esteroides (sitosterol, campesterol, ergosterol, brasicasterol y 7,22 ergostadienol); ácidos grasos, mayormente ácidos linoleico, palmítico y oleico además de pequeñas cantidades de ácidos laurico, 7-tridecenoico, tridecanoico, 7-pentadecenoico, 9-heptadecenoico, heptadecanoico, 11-nonadecenoico, nonadecanoico, 15-eicosenoico, eicosanoico, docosanoico, 15-tetracosenoico, tetracosanoico, mirístico, palmitoleico y esteárico (Dini *et al.* 1994) y

amidas de ácidos grasos: N-benzil octanamida, N-benzil-16-hidroxy-9-oxo-10E, 12E, 14E-octadecatrieneamida y N-benzil-9, 16-oxo-10E, 12E, 14E-octadecatrieneamida, además de otros compuestos afines (Zheng *et al.*, 2000).

2.1.3. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS:

Los estudios farmacológicos de esta planta se han caracterizado por emplear principalmente los macerados acuosos o etanólicos de la parte subterránea, seca y molida, administrada por vía oral o por vía intraperitoneal, en animales de experimentación, sobre todo por cuanto los estudios del grado de toxicidad han demostrado que la maca es inocua (Marcelo *et al.*, 2000; Salas y Uriarte, 1997; Obregón, 1998). En uno de los primeros estudios, Chacón (1997) utilizó el extracto alcaloideo de la maca para probar el efecto estimulante en el sistema reproductor de ratas. En 1994, Lama *et al.*, encontraron que el extracto hexánico de maca posee propiedades estrogénicas en ratas ovariectomizadas. Recientemente los estudios de Zheng *et al.* (2000) han demostrado por vez primera el efecto afrodisíaco en ratas de la fracción lipídica purificada de la maca. Así mismo, se obtuvo un significativo aumento en la conducta sexual, tasa de fertilidad e incremento del peso aplicando maca en la dieta de animales mayores (Álvarez, 1993; Córdor, 1994; Matos, 1995),

Por otro lado, los estudios realizados por Johns (1981, 1986) atribuyen a los glucosinolatos un rol importante en los procesos hormonales reproductivos. Si bien determinadas sustancias de este tipo han sido incluidas dentro de los compuestos aromáticos responsables de importantes propiedades estrogénicas, no se han efectuado estudios farmacológicos al respecto (Obregón, 1998).

Es ampliamente conocido el rol que cumple los andrógenos, estrógenos y progestágenos, el principal grupo de hormonas sexuales implicados en los procesos reproductivos, reguladores además de importantes funciones metabólicas. Diversas variaciones en los niveles hormonales determinan trastornos menopáusicos y es una de las principales causas de infertilidad en mujeres (Pérez, 1995; Ganong, 1990; Guyton, 1992; Alonso, 1998). En el panorama actual de la investigación de los diferentes productos naturales, se ha puesto especial énfasis en las especies vegetales que tienen un importante efecto regulador de los procesos reproductivos. Las sustancias de naturaleza flavonoide,

esteroide o lipídica son las que han demostrado tener un importante efecto a nivel del sistema reproductor animal; en ese sentido son ampliamente conocidos el rol de las sustancias vegetales de naturaleza esteroideal que funcionan como hormonas o estimulantes del sistema hormonal (Bruneton, 1991). Así mismo, diversos extractos de plantas conteniendo ácidos grasos han sido aislados en estos estudios y demostrado ser biológicamente activos (Majunder *et al.*, 1997; Hiremath *et al.*, 1997; Naseem *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 1998). El ancestral e importante empleo dado a la maca como medicina folklórica para mejorar la función reproductiva y/o regularizar el ciclo menstrual podría estar relacionado a un importante contenido en esteroides y ácidos grasos y estos particulares componentes secundarios merecen ser investigados en su actividad biológica (Dini *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2000; Ingram *et al.*, 1968; Knights and Berrie, 1971).

Por todo lo expuesto, se considera que existe la necesidad de profundizar la investigación integral de esta planta, realizando el estudio histológico para determinar la naturaleza anatómica del órgano reservante y los ensayos farmacológicos para determinar la fracción parcial responsable del efecto estimulante de la reproducción.

HIPOTESIS :

1. El órgano reservante de la maca responsable de la actividad terapéutica se considera como una región de transición entre la raíz y el tallo; así mismo la actividad estimulante que posee esta planta en la reproducción animal es determinada por sustancias de tipo lipídico.

2.3. OBJETIVOS:

1. Realizar el estudio de la estructura interna del órgano reservante y parte aérea de la planta.
2. Determinar el efecto de la administración de diferentes extractos lipídicos sobre el sistema reproductor de animales de experimentación (ratones).

2.4. METAS ESPECIFICAS:

1. Caracterizar anatómicamente la estructura interna del órgano reservante de la maca.
2. Obtener las fracciones lipídicas conteniendo ácidos grasos totales y esteroides totales provenientes de un extracto hexánico.
3. Determinación del efecto estimulante de la reproducción de la fracción responsable sobre ovarios de animales de experimentación.
4. Verificación de la dosis responsable del efecto terapéutico en animales de experimentación.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES y EQUIPOS

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

1. Parte subterránea de la planta.
2. Parte área de la planta.
3. Ratones (Swiss albinos) hembras.

2.1.2. REACTIVOS QUÍMICOS y MATERIALES DE VIDRIO:

1. Estudio Histológico:

• Láminas y laminillas	Etanol 96°	Verde rápido
• Placas Petri	Etanol absoluto Q.P.	Cristal violeta
• Lunas de reloj	Xilol Q.P.	Naranja G.
• Frascos Copling	Paraplast	Entellan
• Probetas de 100 cc.	Safranina	Albúmina de Meyer
• Formaldehído neutro 10 %	Ácido acético glacial Q.P.	Hidróxido de potasio Q.P.

2. Extracción de Lípidos totales:

• Éter de petróleo Q.P.	Cloroformo Q.P.	Ácido sulfúrico QP
• Hidróxido de sodio Q.P.	Éter dietílico Q.P.	Hidróxido de potasio Q.P.
• Embudo Buchner	Matraz de 500 cc	Embudo de vidrio
• Silica gel G ₂₅₄ (CCD)	Papel filtro	Hexano Q.P.
• Anhídrido acético Q.P.	Ácido Clorhídrico Q.P.	Etanol 96°
• Iodo metálico	Colesterol Q.P.	Ácido oleico Q.P.

3. Estudio Farmacológico:

• Frascos de boca ancha	Tween-80	Beakers de 100 cc
• Probeta de 100 cc	Éter etílico	Micropipetas 100uL
• Matraz de 500 cc.	Jeringas 1 ml.	Hipodérmica n°18

2.1.3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS:

• Estufa eléctrica	Balanza analítica	Cubeta de vidrio
• Cocinilla eléctrica	Lámpara UV	Micrótopo rotatorio
• Bomba de vacío	Cuchilla de micrótopo	Desecador
• Equipo de destilación	Congeladora	

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. ESTUDIO MORFOHISTOLÓGICO:

El material colectado (macas variedad amarilla) se lavó y secó, se seccionó en sus partes apical, media y distal y finalmente se fijó en FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol).

La inclusión de las muestras en parafina para la obtención de cortes seriados transversales a micrótopo, de las partes distal, media y apical, fue llevada a cabo según Marín (1998). En la coloración y montaje permanente de los cortes se empleó la tinción cuádruple de Johansen (Johansen, 1940) y Entellan¹ respectivamente. En el análisis y caracterización de los tejidos se han empleado los siguientes parámetros:

- Desarrollo de tejidos y dimensiones celulares
- Dimensiones del almidón

Las hojas fueron fijadas en FAA. Se efectuaron secciones transversales y superficiales de las muestras, de la parte media y pecíolo, empleando la tinción verde rápido. Las secciones superficiales fueron aclaradas con KOH 3% (D'Ambrogio de Argüeso, 1986) y esquematizadas a 100 y 400 aumentos por medio de una cámara lucida Zeiss. Se realizaron secciones transversales al estado fresco de la parte subterránea para aplicar las pruebas microquímicas de reconocimiento de esteroides (ácido

¹ Resina sintética que sustituye al bálsamo de Canadá como medio de montaje.

sulfúrico concentrado), antocianinas (reacción ácido-base), así como almidones (lugol), según D'Ambrogio de Argüeso (1986).

2.2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES (extracto hexánico, fracciones ácidos grasos y esteroides totales). Adaptado de Garg *et al.*, 1998 (figura 3).

2.2.2.1. Obtención de la muestra:

5 kg de maca variedad amarilla fueron cortadas en rodajas y secadas en estufa a 65 °C por 3 días y molidas, registrando al final un total de peso seco de 1254 g

2.2.2.2. Maceración:

745.3 g de maca seca y molida fueron sometidos a maceraciones sucesivas en hexano por periodos de 4-5 días en el lapso de 3 semanas hasta agotamiento. Los extractos fueron filtrados y luego concentrados en un sistema refrigerante a temperatura 70° C. con recuperación del solvente. Posteriormente fueron desecados a presión reducida en campana desecadora con silica gel y protegidos de la luz. El extracto obtenido, de color amarillo oscuro y fuerte aroma tuvo un rendimiento de 5.039 g (0.67%) y una parte (1g) fue utilizado para el ensayo farmacológico.

2.2.2.3. Saponificación :

El extracto hexánico obtenido (4 g) fue saponificado con una solución alcohólica de KOH 0.5 M, a 60-70° C, en sistema refrigerante a reflujo hasta sequedad. El insaponificable fue extraído con tres porciones de éter etílico, lavado con NaOH 10% y luego con agua destilada, mientras que el saponificable fue desecado completamente e hidrolizado con HCl 10 % para liberar los ácidos grasos, lavados con agua destilada, secados y redissueltos con cloroformo. Las fracciones obtenidas, ácidos grasos y esteroides totales fueron luego completamente desecadas a presión reducida en campana desecadora con silica gel y sus rendimientos fueron de 0.2260. g (5.6%) para los esteroides totales y 1.4480 g (36.2%) para los ácidos grasos totales.

Con la finalidad de realizar ensayos comparativos, una parte del residuo de la maceración hexánica fue secado hasta evaporación completa del solvente y luego macerado en etanol 80°, filtrado y desecado, constituyendo el extracto etanólico cuyo rendimiento fue de 11.847 g (1.81 %).

2.2.2.4. Identificación de las fracciones:

Las diferentes fracciones obtenidas fueron verificadas con el reactivo de Lieberman para el reconocimiento de esteroides (Lock, 1994), obteniéndose resultados positivos (precipitado verdoso) con el extracto hexánico y la fracción esteroides totales (+++) y negativo con los demás. La identificación cromatográfica se ha dado en cromatografía en capa fina (silica gel G₂₅₄) por comparación de la fracción esteroides totales y colesterol Q.P. (figuras 5, 6 y 7) y ácidos grasos totales y ácido oleico Q.P. (figura 4), en sistema de solventes Hexano - Acetato de etilo (2:1) y Cloroformo – Acetato de etilo (1:1) respectivamente. Los agentes reveladores fueron el reactivo de Lieberman para los esteroides totales y vapores de iodo para los ácidos grasos totales.

2.2.3. ESTUDIO FARMACOLÓGICO:

2.2.3.1. Administración de las fracciones parciales:

Los diferentes extractos: obtenidos fueron administrados en ratones mediante el modelo adaptado de Garg *et al.*, 1998 y Majunder *et al.*, 1997:

Se empleó ratones hembras (cepa Swiss) de 21 días de edad, de 10.18 ± 1.10 g de peso, repartidos en 4 grupos de 8 ratones c/u más un grupo control, mediante el siguiente esquema:

- I Grupo 0 1% Control con tween-80.
- II Grupo 1: 200 mg extracto hexánico.
- III Grupo 2: 200 mg extracto etanólico.
- IV Grupo 3: 100 mg fracción esteroides totales.
- V Grupo 4: 100 mg fracción ácidos grasos totales.

Todas las dosis aplicadas (mg / kg de peso corporal) fueron disueltas en Tween-80 al 1% y administradas diariamente por vía oral durante 16 días. Los animales fueron mantenidos diariamente con alimento balanceado (purina) y agua *ad libitum*.

Con la finalidad de poder cubrir el ciclo estral, se establecieron dos evaluaciones, primero a los 8 días y luego a los 16 días de iniciado los diferentes tratamientos. Al término de cada evaluación, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, los ovarios fueron extraídos, tomando registro de su peso; luego fueron lavados y fijados por 48 horas a 5° C en formaldehído neutro 10 % en buffer fosfato (PBS). Posteriormente las muestras fueron conservadas en etanol 70° a 5° C.

2.2.3.2. Tratamiento histológico de las muestras:

Para el tratamiento histológico se realizó la inclusión en parafina de las muestras según Estrada *et al.* (1982), realizándose cortes longitudinales seriados a micrótopo a 10 micras. Para la coloración se empleó la tinción Hematoxilina - Eosina y Entellan para el montaje permanente de los cortes.

Los parámetros evaluados fueron número y estado de maduración de folículos secundarios, folículos secundarios en crecimiento y folículos maduros (de Graaf) y diámetro y peso de los ovarios. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante la prueba t-Student.

III. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO MORFOHISTOLÓGICO

3.1.1. Descripción de la estructura interna del órgano reservante.

La estructura del órgano reservante presenta características particulares en cuanto a la naturaleza y disposición de los tejidos. Vista en sección transversal, la maca en su parte media presenta un característico cilindro vascular central muy ramificado, en forma de estrella (fotografía 16), rodeado por un cambium vascular en un contorno sinuoso de un encendido color amarillo (fotografía 8); hacia el interior los vasos del xilema se disponen radialmente en medio de abundante parénquima reservante mientras la zona floemática, también parenquimatosa, presenta un color opaco frente al xilema. La mayor parte de la estela constituye la zona medular, conformada por células parenquimáticas reservantes de almidón; estos son de tipo simple, de formas redondeadas o elipsoidales (fotografía 7). En la zona medular se han registrado las mayores dimensiones del almidón así como de las células del parénquima reservante (tabla 1). Adicionalmente, la prueba del ácido sulfúrico concentrado aplicada a esta zona dio positivo para esteroides.

En la periferia se aprecia una serie de células ligeramente rectangulares y suberizadas siendo las más externas de aspecto aplanado y dispuestas en estratos de apariencia desorganizada (fotografías 1 y 2). En ejemplares jóvenes de maca se ha podido apreciar, a nivel de la parte media, una capa epidérmica cutinizada. Las células corticales vecinas presentan paredes engrosadas. Cuando es posible distinguir las células epidérmicas, éstas son de forma ligeramente cuadrada y más grandes que las corticales. No es clara la distinción de un felógeno y más bien las células corticales exteriores presentan un aspecto alargado y aplanado, semejando células suberosas, rectangulares y aplanadas. En

variedades de maca amarilla y morada, la coloración se presenta en éstas células periféricas. La reacción ácido-base para la presencia de antocianinas aplicada en esta zona ha sido positivo.

En la zona cortical se observa haces conductores, de aspecto circular (fotografías 3, 4 y 9), con los vasos del xilema dispuestos radialmente hacia el centro mientras que el floema se distingue por su color opaco, opuesto al xilema. Entre ambos se aprecia una delgada capa meristemática de aspecto parecido a un procambium. Estos haces conductores concéntricos se presentan en toda la zona cortical, especialmente en la zona media y apical, en número de cuatro, cinco o más, y se encuentran ampliamente separados por parénquima reservante (fotografía 18). En las zonas apical y subapical, en contacto con las trazas foliares, se distingue en la parte central una zona medular parenquimatosa, delimitado por vasos del xilema primario (fotografías 5 y 17).

En sección longitudinal, se aprecia el contorno aovado del cilindro vascular que va estrechándose en diámetro de la parte superior hasta la zona distal, dejando en ambos lados una amplia zona cortical; varios haces conductores concéntricos particularmente en sus partes media y superior se distinguen principalmente por el aspecto del xilema en cortas bandas longitudinales. El cambium vascular delimita la zona superior (yema apical) frente a los primordios foliares y florales (fotografía 11). Al interior, en la zona medular, los vasos xilemáticos se presentan radialmente dispersos entre las células parenquimáticas reservantes de granos de almidón. Esta zona es delimitada por el cambium vascular y los vasos primarios del xilema que sin embargo, no lo encierran completamente, si no que permite a la medula estrecharse gradualmente hacia la zona distal del órgano reservante; en esta zona, paralelamente al estrechamiento de la corteza, el cilindro vascular se reduce por desaparición completa del parénquima medular y su reemplazo por el xilema secundario. A este nivel, los vasos del xilema se presentan contraídos longitudinalmente y presentan una bifurcación en forma de "Y" en el tramo inferior próximo a la zona distal (fotografía 15); de ahí en adelante esta zona presenta las características de una raíz de estructura secundaria, con el xilema completamente lignificado (fotografía 10).

3.1.2. Descripción de la parte interna de la parte aérea.

En secciones transversales (fotografías 12 y 14), las hojas basales de la maca presentan una estructura bifacial, con una gruesa cutícula en su lado adaxial. Las células parenquimáticas en empalizada se presentan hasta en tres capas celulares y su aspecto no difiere mayormente de las del parénquima esponjoso. A nivel de la nervadura central las células se presentan alargadas y en sentido paralelo, presentando además, tricomas cónicos unicelulares de característico recubrimiento cuticular (fotografía 13, figura 1). La hoja presenta estomas en ambas superficies (anfiestomática) y son de tipo anisocítico (figura 2).

3.2. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

3.2.1. Cambios gravimétricos e histométricos:

El incremento del peso corporal de los animales evaluados fue similar a lo largo del experimento; los mayores valores se obtuvieron a los 16 días en el control, extracto etanólico y ácidos grasos totales, mientras que los menores se presentaron en los esteroides totales y el extracto hexánico; este último tuvo un menor incremento de peso que los demás tratamientos.

No se presentaron diferencias entre los tratamientos en cuanto al peso de los ovarios al octavo día, en cambio al decimosexto, el extracto hexánico produjo una disminución significativa del peso ($p < 0.05$) (figura 8, fotografía 21). Este mismo extracto ha presentado diferencias significativas en el diámetro de los ovarios a los 8 y 16 días de tratamiento ($p < 0.01$) (tablas 3 y 4). Por otro lado el tratamiento con esteroides totales aumentó significativamente el número de folículos secundarios a los 16 días ($p < 0.05$) (fotografía 20), mientras que el de ácidos grasos totales lo disminuyó (tabla 4).

El diámetro de estos folículos, comprendido entre los secundarios y secundarios en crecimiento, estuvo entre 147.4 y 491.04 micras a los 8 días y entre 120.14 y 445.84 micras a los 16 días. El extracto hexánico presentó los menores valores en el diámetro ($p < 0.01$) (tabla 2). Se ha encontrado por lo menos 1 folículo maduro (de Graaf) en la mayoría de los ovarios evaluados y su diámetro fue constante en los tratamientos y promedió 563.69 micras.

IV. DISCUSION

Desde el punto de vista taxonómico, la maca, única representante de la familia Brassicaceae cultivada en la Puna, fue primeramente determinada como *Lepidium meyenii Walpers*, sobre la base de su semejanza con el primer ejemplar descrito por G. Walpers en 1843. Chacón (1990), tras una revisión botánica de los ejemplares de maca cultivados en los Andes Centrales y notar las diferencias existentes entre el ejemplar descrito por Walpers y la maca actualmente cultivada, concluyó que esta planta no fue realmente determinada, por lo que la describió como una especie nueva, *Lepidium peruvianum*. Al menos siete especies silvestres del género *Lepidium* han sido reportados para el Perú por Brako y Zarucchi (1993), desde el Departamento de Ancash hasta Puno; asimismo otras especies de *Lepidium* han sido colectadas en Ecuador, Bolivia y Argentina. Prácticamente se sabe muy poco acerca de estas especies y de su posible relación con la maca cultivada. Si bien las especies silvestres de *Lepidium* han mostrado un bajo polimorfismo en estudios de marcadores moleculares (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente: RAPD) y por tanto estar alejadas de la maca cultivada (Quiroz and Aliaga, 1997), la temprana domesticación precolombina de una especie silvestre de este cultivo por parte de los antiguos peruanos es la teoría mas ampliamente difundida. Sin embargo, se requiere de una revisión sistemática de las especies del género *Lepidium* existente en el país para la verificación de su actual posición taxonómica (Quiroz and Aliaga, 1997).

Acorde con los estudios histológicos de Metcalfe y Chalk (1959) y León (1964), la raíz primaria de la maca presenta una estela diarca, lo cual determinaría una raíz muy delgada o de escaso grosor en un posterior crecimiento secundario. Por lo general, muchas especies herbáceas de la familia Brassicaceae presentan este tipo de estela (Simonds, 1938). Según Esaú (1959), las estelas de tipo pentarca, hexarcas y heptarcas están generalmente asociadas a mayores diámetros de la raíz en su desarrollo. Sin embargo es evidente que durante el temprano desarrollo de la maca, se produce en la estela una proliferación importante del parénquima asociado a un ordinario orden de los tejidos. A diferencia del rabanito (*Raphanus sativus*) y la zanahoria (*Daucus carota*), los mayores diámetros alcanzados por el órgano reservante de la maca, son el producto de una constante actividad cambial secundaria, es decir cambiumes anómalos de desarrollo posterior al cambium vascular, que localizados en la corteza son los que determinan una masiva proliferación de parénquima y con ello el mayor grosor del órgano reservante.

Sería difícil afirmar si el órgano reservante es raíz o es tallo sin emprender un adecuado estudio de su ontogenia, es decir del proceso de formación del órgano, desde sus estadíos iniciales. La presencia de una definida zona parenquimatosa en la zona apical representaría una parte del tallo y en concreto la yema apical de una planta acaule, en contacto estrecho con los primordios de hojas y flores. Sin embargo, el contorno del cambium vascular en la estela, estrechándose desde la zona apical hacia la distal, la presencia de una médula parenquimatosa y vasos xilemáticos primarios, señalan la posibilidad de ser la región de transición entre el tallo y la raíz quien asumiría la mayor parte del engrosamiento del órgano de reserva; la raíz propiamente dicha ocuparía la zona distal del órgano con una típica estructura secundaria. No obstante en el desarrollo secundario alcanzado, la disposición radial de los vasos xilemáticos junto con la masiva producción de parénquima reservante de almidón hacen ver a esta región con la apariencia de una raíz. Sin embargo, es posible señalar puntualmente la transición, entre la estela caulinar parenquimatosa de las zonas apical y media, y la estela radical completamente lignificada de la zona distal del órgano reservante: desde la zona distal hacia la parte superior del órgano, los vasos xilemáticos divergen en dos ramales desde el inicio de la zona engrosada, mostrando entonces la aparición de una zona medular (fotografía 15).

Por otro lado, la presencia de vasos xilemáticos contraídos en el comienzo de la zona distal es característica de una región de transición (Esaú, 1959) y el aspecto arrugado que presenta externamente el órgano reservante, es una clara evidencia de la contracción de los tejidos desde un temprano desarrollo. Posiblemente durante su temprano desarrollo, la parte superior del hipocótilo asumiría el mayor engrosamiento y a una contracción generalizada del tejido se debería su acortamiento hacia la raíz; según esto la región de transición en la maca sería mas bien corta (Esaú, 1959). Luego, la temprana aparición de la actividad cambial secundaria en la corteza determinaría la formación de un cuerpo caroso a escasa profundidad del suelo.

En cuanto a las células de la cubierta externa o periféricas, la dificultad en observar claramente un felógeno y la forma y aspecto de estas células determinaría que no se tratase de una típica peridermis sino más bien de una epidermis suberizada; probablemente células corticales primarias empujadas hacia el exterior por el crecimiento secundario, finalmente colapsadas y suberificadas. Su fin primordial sería la de proporcionar una protección externa; esto es típico en plantas herbáceas que no alcanzan un completo desarrollo secundario con formación de peridermis (Strasburger, 1996; Esaú, 1959; Quiroz and Aliaga, 1997). Además, estas células presentan una forma diferente al de una típica célula suberosa y en los ejemplares jóvenes de maca morada, curiosamente presentan un contenido de antocianinas, un pigmento que difícilmente se encuentra en una capa suberosa compuesta por células muertas y que presentan además suberina en sus paredes. Sin embargo, en algunos ejemplares de maca maduros, estudiados en plena floración, se ha podido observar el desarrollo de una capa peridérmica por debajo de estas células corticales suberizadas, lo que presumiblemente puede interpretarse como una continuación del desarrollo secundario de los tejidos en esa etapa del desarrollo.

Finalmente, el órgano reservante de la maca presenta un modelo particular de crecimiento anómalo en donde la actividad cambial secundaria se da exclusivamente en la zona cortical del órgano reservante. Este tipo de actividad anómala se presenta en diversas especies vegetales, tanto en tallos como en raíces y generalmente se presenta al interior de la estela como una variedad de cambiumes supernumerarios. Acorde a Metcalfe y

Chalk (1959), haces vasculares corticales en especies de Brassicaceae sólo han sido reportados para el género *Lepidium* y en concreto para *Lepidium latifolium*.

En secciones transversales realizados en plantas de maca cultivadas en la Costa y que sin embargo no desarrollaron un cuerpo carnoso, ha sido posible observar una disposición similar de los tejidos, con la diferencia de presentar una estrecha zona cortical y más bien la zona medular es amplia en su parte apical; la zona distal presenta el característico desarrollo secundario, sin medula o parénquima reservante. Dado el reporte de León (1964) acerca del crecimiento anómalo en la maca desde su temprano desarrollo, es probable que ésta sea influenciada por las condiciones del medio ambiente propio de su hábitat altiplánico.

En los estudios fitoquímicos, Dini *et al.* (1994), registra un alto contenido de lípidos (2.2 %) de la parte subterránea de la planta, especialmente importante es su contenido en grasas insaturadas, principalmente ácido linoleico (32,6%), ácido palmítico (23.8%) y ácido oleico (11.1%). El contenido en fitoesteroles esta representado por sitosterol (45%), campesterol (27%) y ergosterol (13.6%) entre los principales. Las maceraciones sucesivas en hexano hasta agotamiento de la muestra se presentaron un rendimiento regular en lípidos totales (0.6%) comparado con el rendimiento extracto del etanólico (1.8%), Asimismo se obtuvo una mayor cantidad de ácidos grasos totales (36.2%) comparado con el insaponificable (5.6%). La desecación de estos extractos a presión reducida, evitando el contacto con la atmósfera, ha impedido su enranciamiento, de esta forma se pudo conservar sin alteraciones las fracciones obtenidas, que en los esteroides totales fueron de un color amarillo claro y fuerte aroma mientras que en los ácidos grasos totales fue de un marrón claro.

Es notable el importante contenido de lípidos que presenta la maca, teniendo en cuenta que ni raíces ni tubérculos, almacenan mayormente grasas y que además en la familia Brassicaceae, preferentemente estas sustancias de reserva se hallan presentes en las semillas (Knights and Berrie, 1971).

Dentro del ensayo farmacológico, la administración de las diferentes sustancias, no produjo alteraciones tanto en la alimentación como en la conducta de los animales evaluados; sin embargo, investigaciones recientes han reportado un efecto afrodisíaco en ratas para los extractos lipídicos de maca (Zheng *et al.*, 2000).

La dosis ensayada de esteroides totales (100 mg / Kg) produjo el incremento significativo en el número total de folículos a los 16 días de tratamiento, por lo que se puede tratar del efecto de la acumulación de estos componentes sobre la formación y maduración de los folículos.

Por otro lado, a partir del octavo día, la dosis de 200 mg / kg del extracto hexánico produjo la disminución progresiva en el diámetro de los folículos (tablas 2, 3 y 4) y del diámetro y peso de los ovarios (figura 8) durante todo el experimento; este resultado es similar al efecto causado por el citrato de Clomifeno, un conocido inductor de la ovulación y de hecho, altas dosis de esta sustancia conducen a una atresia folicular y formación de quistes ováricos (Pérez, 1995); debido a este efecto antiestrógeno en los ovarios, es posible comparar la dosis del extracto hexánico (200 mg / kg) a la de un exceso de estrógenos, perceptible claramente a los 8 días y con un incremento mayor a los 16 días de tratamiento.

La mayor producción de folículos secundarios en la fracción esteroides totales es atribuible sin duda a una acción estimulante de los fitoesteroides presentes en la maca y reportados en la literatura especializada (Dini *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2000). Este efecto sobre la foliculogénesis es percibido mayormente sobre la formación de los folículos secundarios a los 16 días de tratamiento. Al conocimiento comúnmente aceptado del papel que cumplen los esteroides en los procesos reproductivos, generalmente como precursores hormonales (Alonso, 1998; Bruneton, 1991), es posible esbozar el mecanismo de acción de esta fracción aislada si comparamos su efecto similar a los estrógenos.

Este tipo de hormonas tiene una acción anabólica general, ya que estimulan el desarrollo de los tejidos y contribuyen a mantenerlos en buen estado. En el sistema reproductor actúan en el hipotálamo e hipófisis con acciones estimuladoras e inhibitoras, de acuerdo a dosis, etapa del ciclo en que actúen u otras variantes. Sensibilizan a la hipófisis y determinan una mayor respuesta de ésta a la acción de las gonadotrofinas. En el ovario, a

dosis adecuadas, estimulan el desarrollo folicular; sin embargo, a dosis mayores o sin ciclicidad, inhiben la secreción gonadotrófica y producen atresia ovárica (Pérez, 1995).

El efecto estimulador sobre los folículos de Graaf mencionado tempranamente en los primeros estudios sobre la maca es un claro indicio de su efecto en la fertilidad o tasa reproductiva (Chacón, 1997); diversos estudios han presentados evidencias notables del efecto de la maca a nivel de la conducta sexual y la tasa de fertilidad, así como en el incremento del peso corporal en animales (Álvarez, 1993; Cóndor, 1994; Matos, 1995) si bien este efecto ha sido obtenido a través de su administración en la dieta diaria. El reporte de Lama *et al.* (1994) acerca del efecto estrogénico de la maca es uno de los primeros estudios en donde se ensaya el efecto de un extracto hexánico en animales. Las sustancias de tipo lipídico han demostrado tener un importante rol en los procesos reproductivos. Particularmente, los ácidos grasos palmítico y oleico, entre otros han sido reportados como sustancias de actividad inmuncontraceptiva en animales de experimentación (Garg *et al.*, 1998) y esta actividad podría estar relacionada con la disminución significativa de los folículos con la fracción ácidos grasos totales hallados durante el experimento. Adicionalmente, el ensayo del extracto etanólico (proveniente del residuo o marco del extracto hexánico) fue comparable al del control y demuestra claramente que sus componentes secundarios no poseen influencia alguna sobre la formación de folículos secundarios (fotografía 19).

Se han planteado diversas relaciones de los constituyentes químicos de la maca y los procesos reproductivos. El ensayo del extracto alcaloideo en ratas efectuado por Chacón (1997) si bien reportó a los alcaloides como los responsables del efecto estimulante de la reproducción, sus hallazgos no fueron posteriormente comprobados.

Por otro lado, Johns (1986) planteó la relación existente entre la composición química similar en glucosinolatos entre la maca y la mashua (*Tropaeolum tuberosum*), ambas plantas de la zona alto andina, para demostrar la influencia de este tipo de compuestos sobre la reproducción, sin embargo los glucosinolatos están siendo investigados principalmente por su posible actividad anticancerígena y no se han realizado ensayos farmacológicos que evidencien una actividad estimulante de la reproducción (Genyi *et al.*, 2001; Obregón, 1998).

En la actualidad, debido a sus propiedades vigorizantes y afrodisiacas avaladas por la medicina tradicional peruana, la maca esta siendo comercializada en el extranjero en forma similar al ginseng coreano ("Peruvian ginseng") y se ha planteado una acción similar de los componentes esteroideos presentes en esta especie del género *Panax* con los de la maca (Rivero, 1998). Los resultados presentados por Zheng *et al.* (2000) han demostrado por primera vez el efecto afrodisíaco de los extractos lipídicos de la maca en animales de experimentación; administrados por vía oral en ratas y ratones machos estos extractos han mostrado un fuerte efecto en el aumento de la conducta sexual y la disfunción eréctil de los animales. Si bien esta fracción lipídica ensayada, ha mostrado tener nuevos reportes de ácidos grasos insaturados, la variedad de componentes adicionales de estos extractos, entre los que se encuentran los fitoesteroles y ácidos grasos ya reportados anteriormente, así como también isotiocianatos, sólo confirmarían el efecto fertilizante o estimulante de la reproducción de los preparados de maca y no de fracciones químicamente aisladas de la misma.

V. CONCLUSIONES

5.1. Estudio Morfoanatómico:

1. El órgano reservante de la maca está constituido en su mayor parte por una zona engrosada con características de una región de transición entre el tallo y la raíz; presenta además, un tipo particular de actividad cambial anómala, en la forma de haces conductores secundarios localizados en la zona cortical. La cubierta externa del órgano reservante está conformada por células corticales suberificadas.
2. La hoja, de estructura interna bifacial, anfiestomática, presenta tricomas unicelulares de tipo cónico.

5.2. Estudio Farmacológico:

1. La fracción esteroides totales, en dosis de 100 mg / kg, presenta un efecto estrogénico sobre los ovarios de ratones evaluados, aumentando significativamente el número de folículos secundarios a los 16 días de tratamiento.
2. El extracto hexánico y la fracción ácidos grasos totales, a dosis de 200 mg / kg y 100 mg / kg respectivamente, presentaron un efecto antiestrogénico sobre los ovarios de ratones evaluados, disminuyendo significativamente el peso y diámetro de los mismos, así como el diámetro de folículos secundarios, a los 8 y 16 días del tratamiento.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliaga, R. Biología Floral de *Lepidium meyenii* Walp. [Tesis magíster]. Lima: Univ. Nac. La Molina; 1995.

Alonso, J. Tratado de Fitomedicina. 1ra. ed. Buenos Aires: Editorial Isis. 1998.

Antunez de Mayolo, S. La Nutrición en el Antiguo Perú. En resúmenes del III Congreso Peruano El Hombre y la Cultura Andina. Segunda serie. Tomo V. 1977.

Álvarez, C. Utilización de diferentes niveles de "maca" en la fertilidad de cobayos. [Tesis título]. Pasco. Univ. Nac. A. Carrión. 1993.

Baquerizo, V. Estudio Químico Nutricional de *Lepidium meyenii* Walp. (Maca) y de *Aiphanes* var. *Deltoidea* Burret (Shica). [Tesis título]. Lima. Univ. Nac. Mayor San Marcos. 1968.

Brako, L. and Zarucchi, J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden. New York. 45:I-XI:1-1286. 1993.

Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. 1ra. ed. Zaragoza: Editorial Acribia. 1991.

Canales *et al.* Evaluación Nutricional de *Lepidium meyenii* (maca) en ratones albinos y su descendencia. En resúmenes del VI Congreso Peruano de Farmacia y Bioquímica. 24-29 octubre. Lima; 1993.

Cóndor, D. Influencia de la Maca en el incremento en peso, en la reproducción y descendencia de borregas en la cooperativa Comunal San Ignacio de Junín. [Tesis título]. Pasco. Univ. Nac. A. Carrión. 1994.

Chacón, G. La importancia de *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) en la alimentación y salud del ser humano y animal 2,000 años antes y después de Cristo y en siglo XXI. Lima. 1997.

Chacón, G. La Maca *Lepidium peruvianum* sp. Nov. y su hábitat. En Rvta. Per. Biol. 1990: 171-272.

Dini *et al.* Chemical Composition of *Lepidium meyenii*. En Food Chem. 1994 (49) : 347 – 349.

D'ambrogio de Argüeso, A. Técnicas en Histología Vegetal. 1ra ed. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 1986.

Esaú, K. Anatomía Vegetal. 1ra. ed. Barcelona: Ediciones Omega. 1959.

Estrada *et al.* Manual de Técnicas Histológicas. 1ra. ed. México: AGT Editores. 1982.

Ganon, W. Fisiología Médica. 2da edición. México: Editorial Manual Moderno. 1990.

Garg *et al.* Inmun contraceptive activity guided fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts. En J Ethnopharm. 1998. 60 : 235-246.

Garro *et al.* Extracción, separación e identificación de alcaloides de *Lepidium meyenii* (maka). En resúmenes del VI Congreso Peruano de Farmacia y Bioquímica. 24-29 Oct. Lima. 1993.

Genyi *et al.* Glucosinolate Contents in Maca (*Lepidium peruvianum*, Chacón) Seeds, Sprouts, Mature Plants and Several derived Commercial products. En Econ. Bot. 2001; 55 (2): 255-262.

Guyton, A. Tratado de Fisiología Médica. 2da. ed. México: Editorial Interamericana Mc Graw Hill. 1992.

Hiremath *et al.* Antiandrogenic effect of *Striga orobanchioides*. En J Ethnopharm. 1997. 56: 55 - 60.

Ingram *et al.* Studies in the cruciferae: changes in the composition of the sterol fraction following germination. En Phytochem. 1968 (7):1241 – 1245.

Johansen, A. Plant Microtechnique. 1ra. ed. New York: Editorial Mc Graw Hill. 1940.

Johns, T. Chemical selection in Andean domesticated tubers as a model for the acquisition of empirical plant knowledge. En Plants in Indigenous medicine and diet biobehavioral approaches. Etkin, N.L. (ed.) 1986. New York. 268 – 288.

Johns, T. The añu and the maca. En J Ethnob. 1981 (1) 208 – 212.

Knights, B. and Berrie, M. Chemosystematics: seed sterols in the cruciferae. En Phytochem. 1971. Vol. 10: 131 - 139.

Lama *et al.* Estudio de la propiedad estrogénica de *Lepidium meyenii* Walp (maca) en ratas. En resúmenes del II Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Lima. Octubre 17-21. 1994.

León, J. The Maca (*Lepidium meyenii*), a little-know food plant of Perú. En Econ. Bot. 1964. 18:122-127.

Lock, O. Investigación Fitoquímica. 2da. ed. Lima: Fondo Editorial Pont. Univ. Católica. 1994.

Majunder *et al.* Anti-steroidogenic activity of the petroleum ether extract and fraction 5 (fatty acids) of carrot (*Daucus carota* L.) seeds in mouse ovary. En J Ethnopharm. 1997. 57: 209 - 212.

Marín, M. Estudio Anatómico del Desarrollo de la Raíz Reservante de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. [Tesis – título] . Lima. Univ. Nac. San Marcos. 1998.

Marcelo *et al.* Ausencia de Toxicidad Aguda y Citotoxicidad de *Lepidium meyenii* (maca). En libro de resúmenes del I Congreso Internacional FITO 2000. Lima. 2000. 165 – 166.

Matos, T. Efecto de la “maca” (*Lepidium meyenii* Walp.) en la presentación del celo en vaquillas Holstein. Concepción. [Tesis título]. Huancayo. Univ. Nac. Centro del Perú. 1995.

Metcalfe, C. and Chalk, L. Anatomy of Dicotyledons. 1 ed. Oxford: Clarendon Press. 1950.

Naseem *et al.* Antispermatogetic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. En J Ethnopharm. 1998. 61: 9 -16.

Obregón, V. Maca, planta medicinal y nutritiva del Perú. 1ra. edición. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano. 1998.

Pérez, E. Infertilidad, Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción. 2da. ed. México: Editorial Salvat. 1995.

Quiroz C. and Aliaga R. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). En Andean roots and tubers: ahupa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized

neglected crops. 21 International Plant Genetic Resources Institute. M. Hermann, M. and Hellers, J. editors. CIP. 1997.

Rivero, A. Información Científica sobre *Lepidium meyenii* (Maca). Public. Naturalfa – Química Suiza. Lima. Junio 1998.

Salas, A. y Uriarte, O. Investigación de los efectos de la Maca (*Lepidium meyenii*) en la nutrición y la actividad vigorizante en ratones. En resúmenes del VII Congreso Peruano de Nutrición. Lima. 1997.

Simonds, A. The Anatomical Development of *Lepidium draba*. En J Agric Res 1938. Washington D.C. Vol. 57. No. 12: 917 – 928.

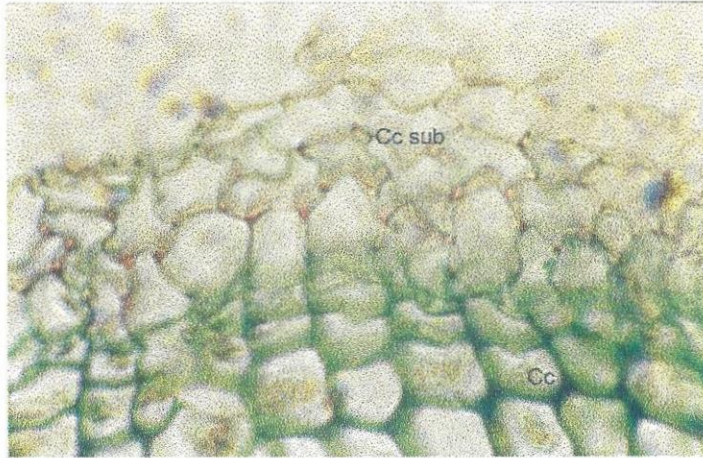
Strasburger, E. Botánica. 7ma. Edición. Barcelona: Editorial Marín. 1996.

Tovar, O. Plantas Medicinales del Valle del Mantaro. Publicación CONCYTEC. Lima. 2001.

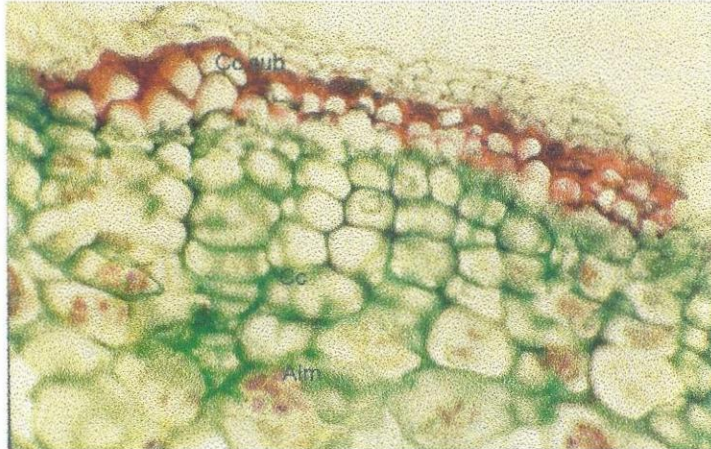
Yllesca G. Estudio Químico y Fitoquímico comparativo de 3 ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp. "Maca" [Tesis título]. Lima. Univ. Nac. Mayor San Marcos. 1994.

Zheng *et al.* Effect of a lipidic extrac from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. In Urology. 2000. Vol. 55: 4. 598-602.

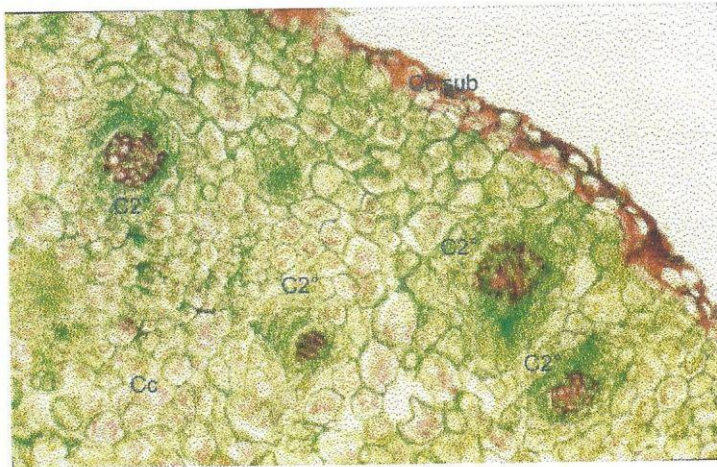
VII. ANEXO



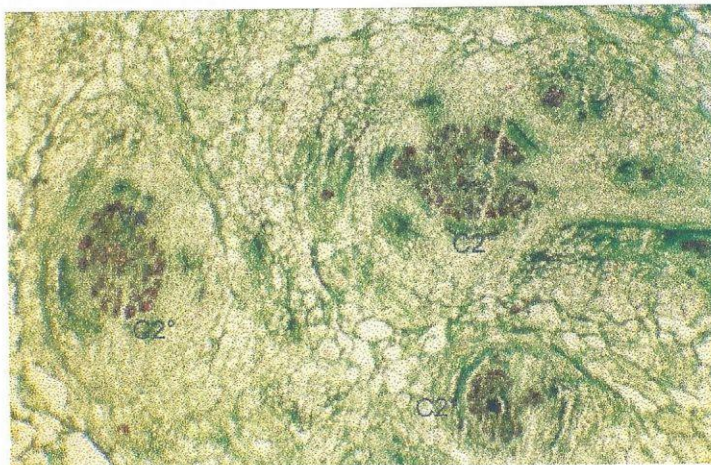
Fotografía 1. Detalle de las células corticales suberificadas (Cc sub) por el crecimiento secundario. (Cc) Células corticales. 250 X.



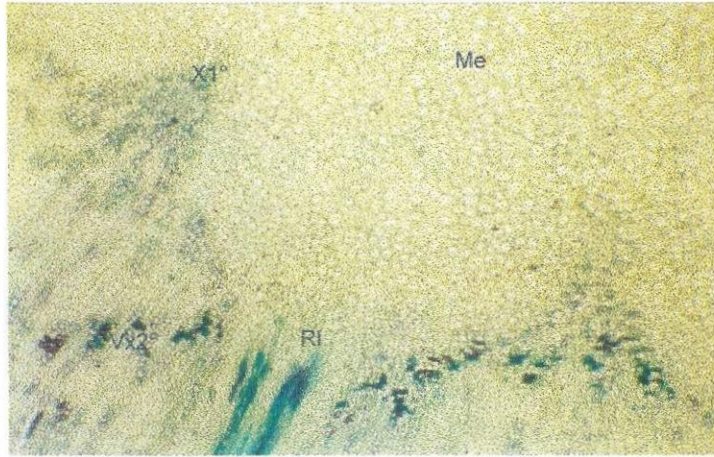
Fotografía 2. Corteza externa del órgano reservante y células corticales suberificadas. 250 X.



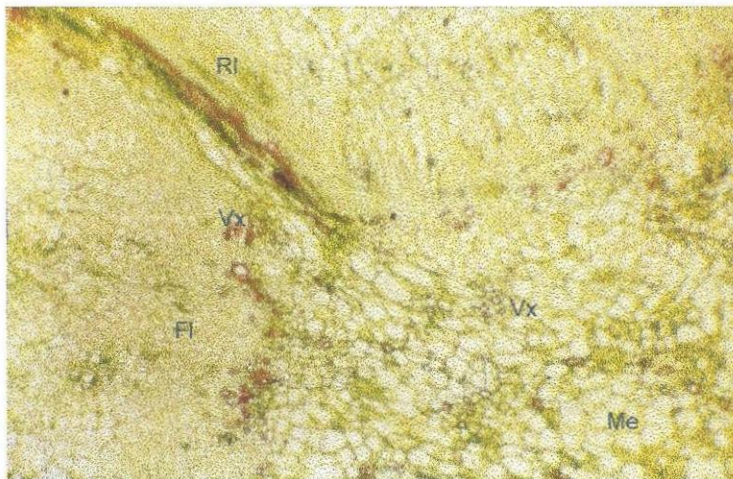
Fotografía 3. Desarrollo incipiente de cámbiumes secundarios (C2°) en la zona cortical externa. 100 X.



Fotografía 4. Presencia de cámbiumes secundarios (C2°) en la zona cortical. 100 X.



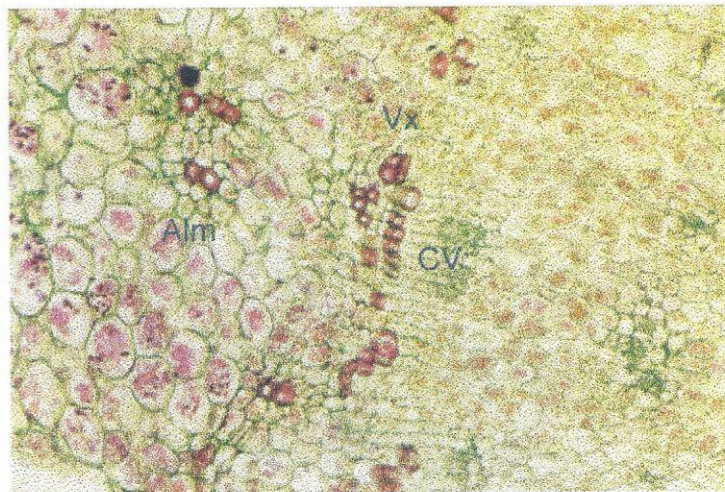
Fotografía 5. Zona medular (Me) y vasos primarios del xilema (Vx) en zona subapical del órgano reservante. (RI) Raíz lateral). 100 X.



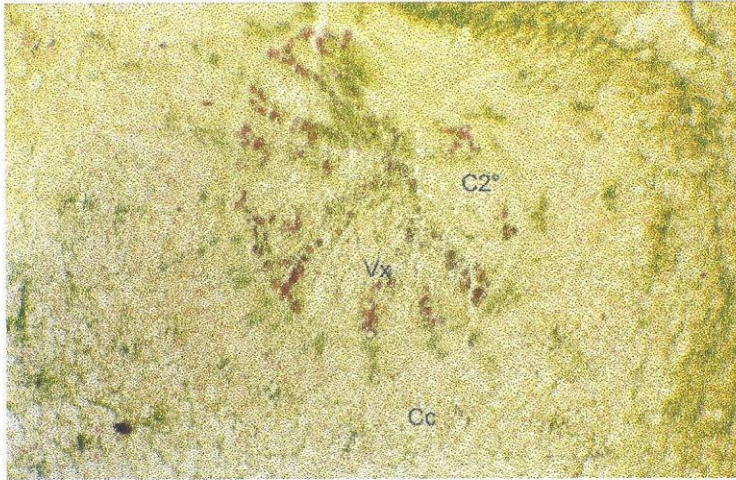
Fotografía 6. Vasos del xilema (Vx) primario y la médula (Me) en la zona media del órgano reservante. (FI) Floema. 100 X.



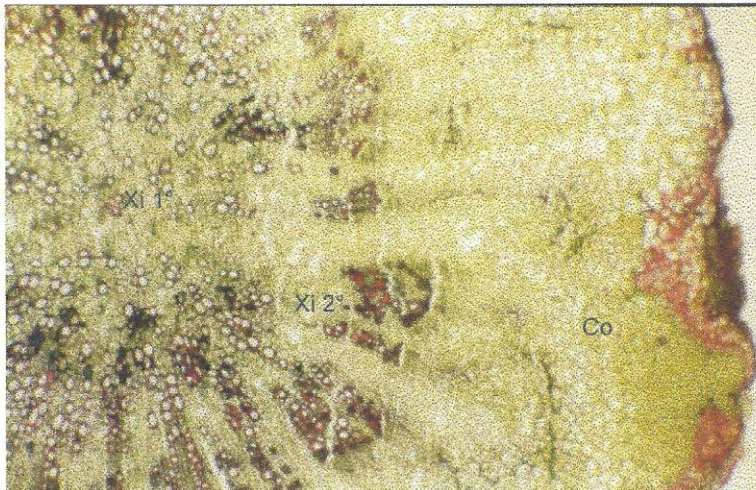
Fotografía 7. Células parenquimáticas reservantes de Almidón (Alm). 400 X.



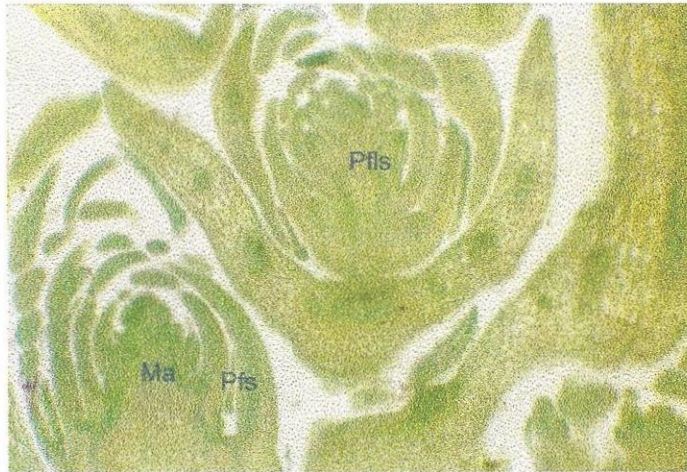
Fotografía 8. Detalle del cambium vascular (CV) y el parénquima reservante xilemático (Vx). 250 X.



Fotografía 9. Cambium secundario (C2°) localizado en la zona cortical. Se observa la disposición radial de los vasos xilemáticos (Vx). 100 X.



Fotografía 10. Zona distal del órgano reservante. Se observa el desarrollo secundario radical. Corteza (Co), xilema secundario (Xi 2°). 100 X.



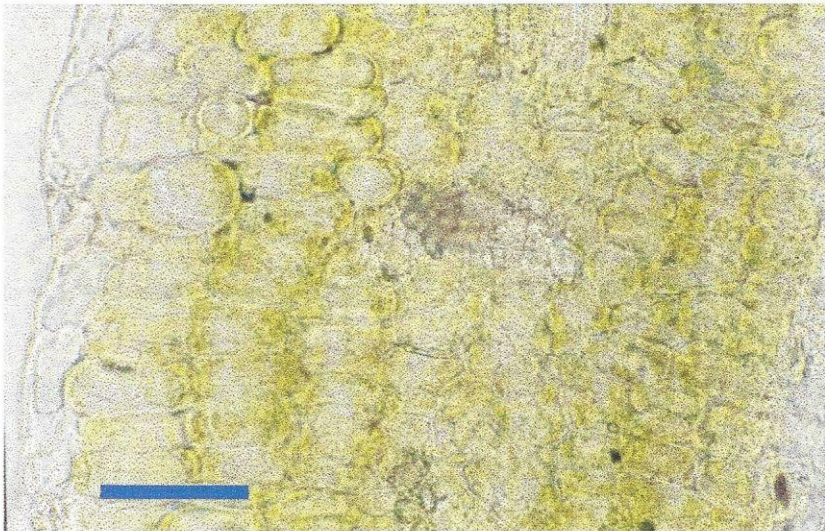
Fotografía 11. Sección longitudinal de la zona apical del órgano reservante. Se observa el meristemo (Ma) y el desarrollo de los primordios foliares (Pfs) y florales (Pfls). 100 X.



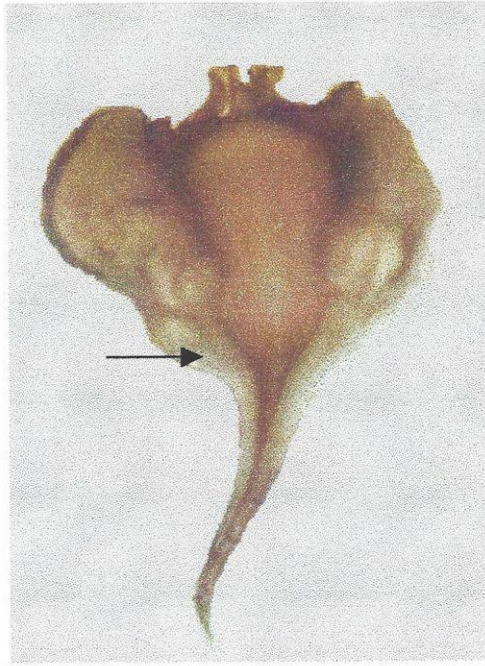
Fotografía 12. Sección transversal de la hoja. Se observa la estructura bifacial. Barra = 100 micras.



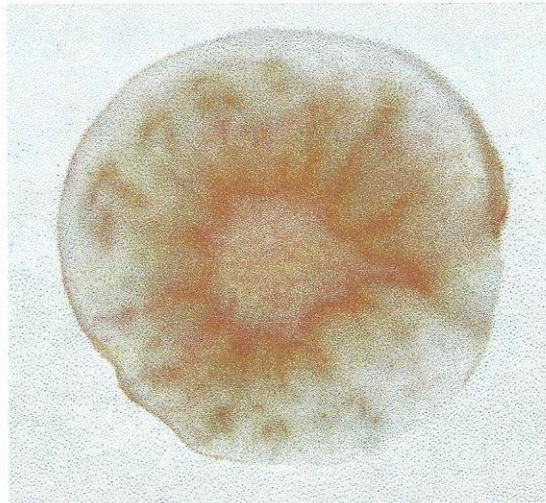
Fotografía 13. Tricoma cónico unicelular en la superficie adaxial y la gruesa capa cuticular. Barra = 50 micras.



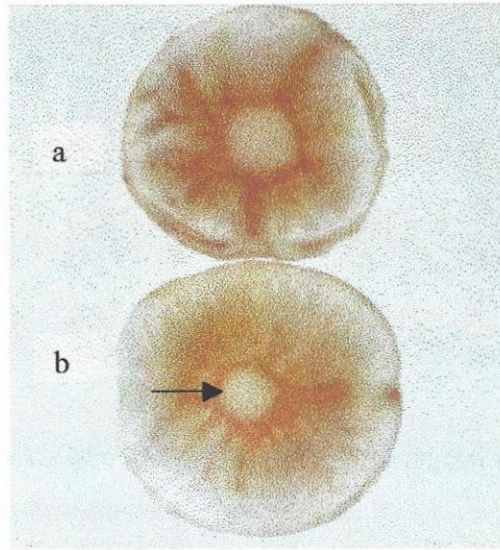
Fotografía 14. Sección transversal de la hoja de maca. Se observa el parénquima empalizada. Barra = 50 micras.



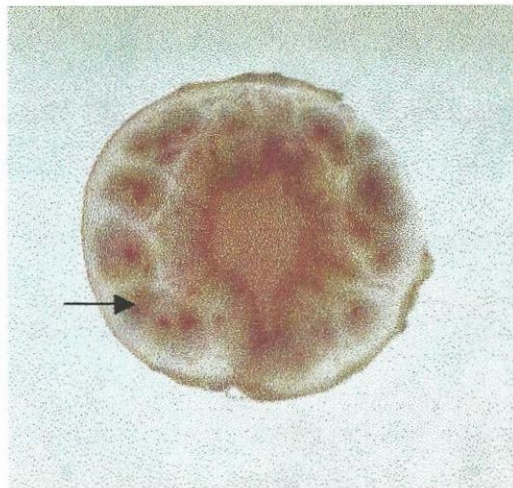
Fotografía 15. Sección longitudinal del órgano reservante.
La flecha señala la divergencia del xilema en la zona distal



Fotografía 16. Sección transversal del órgano reservante.
Se observa contorno en forma de estrella del xilema.



Fotografía 17. Detalle comparativo de las zonas apical (a) y subapical (b) del órgano reservante. La flecha señala la médula parenquimatosa.



Fotografía 18. Sección transversal del órgano reservante. La flecha señala los cámbiums secundarios en la corteza.



Fotografía 19. Sección longitudinal del ovario de ratón en el tratamiento Control. 100 X.



Fotografía 20. Efecto de los esteroides totales en desarrollo folicular y crecimiento del ovario de ratón. 100 X.



Fotografía 21. Efecto del extracto hexánico en el desarrollo folicular y crecimiento del ovario de ratón. 100 X.

Tabla 1. Principales aspectos morfométricos de órgano reservante de *Lepidium meyenii* Walpers (maca).

Parámetros	Promedio (um) ± S.D.
Diámetro de células suberizadas	111.5 ± 38.2
Número de capas celulares suberizadas	5 ± 0.4
Diámetro de células corticales	179.11 ± 34.05
Diámetro de almidón cortical	37.09 ± 4.87
Diámetro de células medulares	239.19 ± 36.01
Diámetro de almidón medular	39.58 ± 5.53

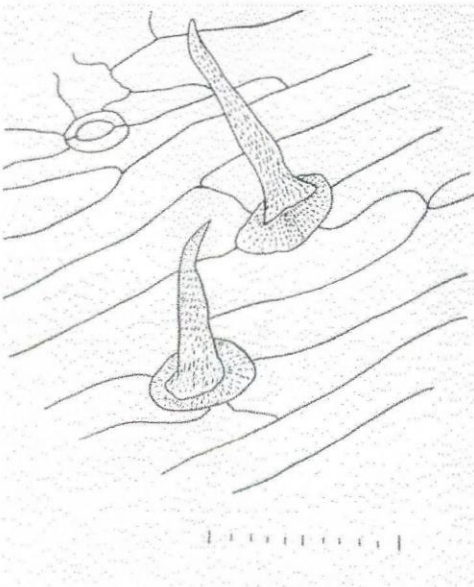


Figura 1. Tricomas unicelulares en la superficie abaxial. 400 X.

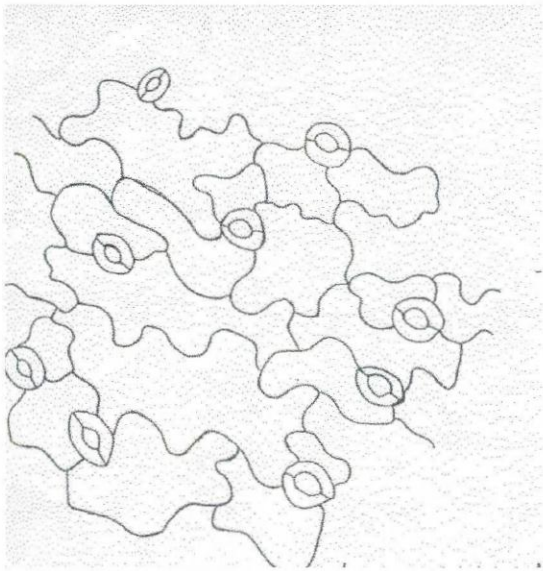
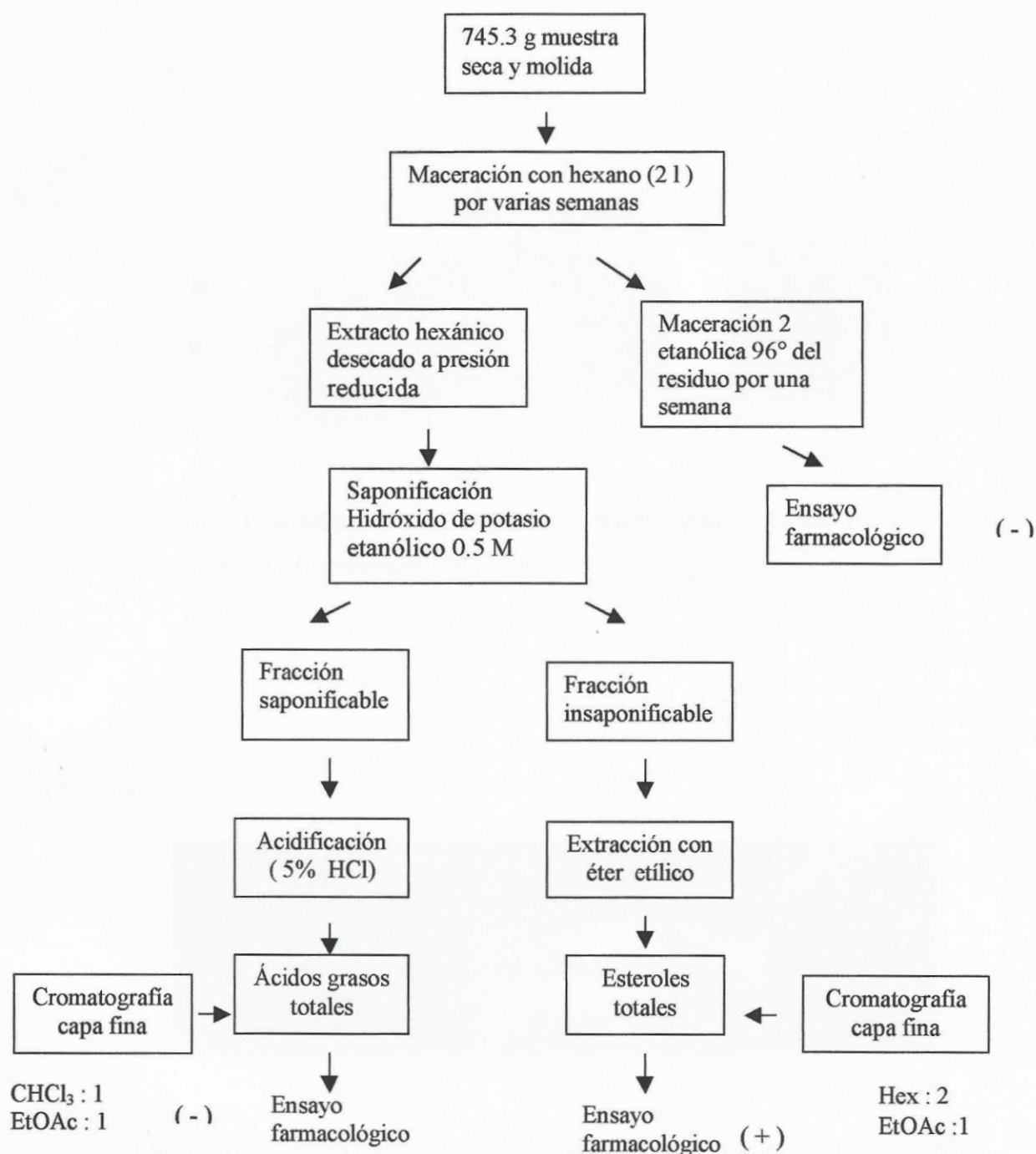


Figura 2. estomas tipo anisocítico en la superficie abaxial de la hoja. 400 X.



(-) Resultados negativos (+) Resultados positivos

Figura 3. Flujograma de la extracción de lípidos totales (fracción lipídica), ácidos grasos y esteroides para identificación cromatográfica y ensayo farmacológico. Adaptado de Garg *et al.*, 1998.



Figura 4. Cromatograma de la fracción ácidos grasos totales (D), y ácido oleico (E) revelado con vapores de yodo.



Figura 5. Cromatograma de la fracción esteroides totales (A) y colesterol (B) con luz ultravioleta.

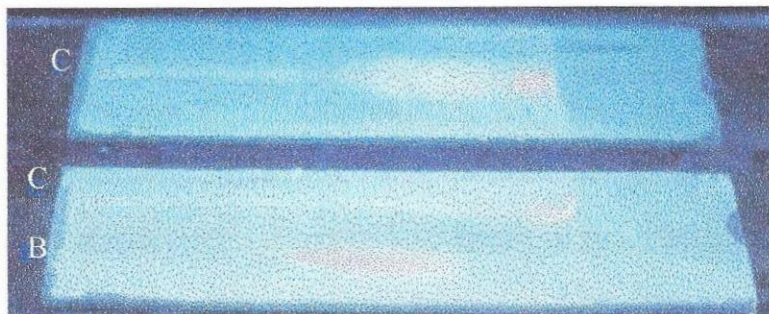


Figura 6. Cromatograma de la fracciones esteroides totales (C) y colesterol (B) con luz ultravioleta.



Figura 7. Cromatograma de la fracción esteroides totales (C) y colesterol (B) revelado con el reactivo de Lieberman.

Tabla 2. Efecto de tratamientos evaluados sobre el número y diámetro de folículos secundarios y folículos secundarios en crecimiento a 16 días. ^a

Tratamientos	Número folículos 2°	Diámetro folículos 2°	Número folículos 2° en crecimiento	Diámetro folículos 2° en crecimiento
Esteroles totales	8.42 ± 2.76*	325.96 ± 52.47**	9.28 ± 2.49	177.27 ± 43.74
Etanólico	5.62 ± 1.40	384.89 ± 61.50	6.50 ± 1.51	189.72 ± 75.26
Control	5.37 ± 0.91	392.16 ± 53.68	7.37 ± 2.44	199.52 ± 37.87
Ac. grasos totales	5.12 ± 0.83	364.0 ± 60.61	5.37 ± 1.18	218.52 ± 40.83
Hexánico	6.77 ± 2.43	305.09 ± 63.18**	7.22 ± 2.16	160.87 ± 40.73**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con el control. a : Datos promedios en micras ± desviación estándar

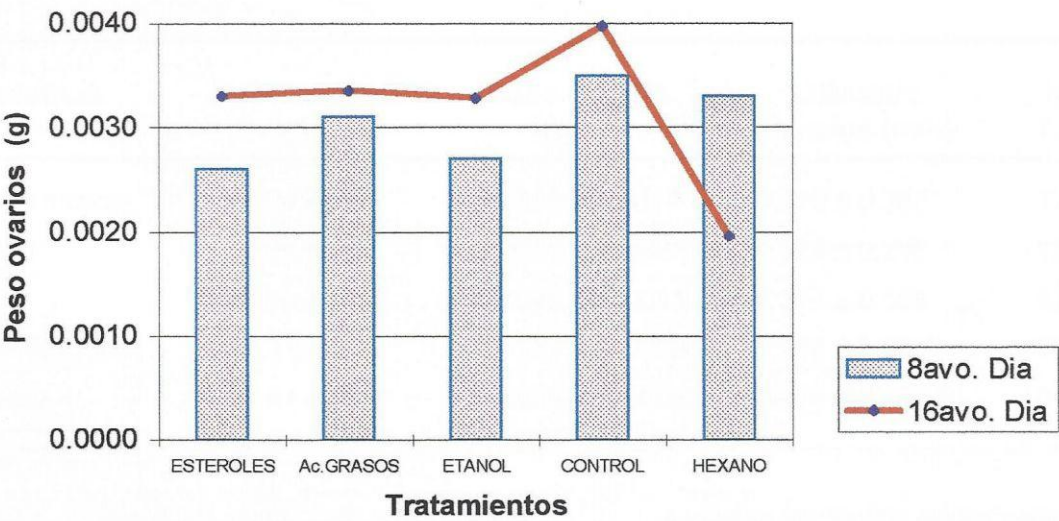


Figura 8. Variación del peso de ovarios en los tratamientos evaluados.

Tabla 3. Efecto de los tratamientos sobre peso, diámetro de ovarios y número de folículos secundarios a 8 días.^a

Tratamientos	Peso corporal (g)	Peso ovarios (g)	Diámetro ovarios (mm)	Número folículos
Esteroles totales	11.02 ± 1.63	0.0026 ± 0.001	1.716 ± 0.266	13.7 ± 1.58
Etanólico	13.02 ± 1.28	0.0027 ± 0.001	1.012 ± 0.159	9.8 ± 1.13
Control	12.03 ± 1.44	0.0035 ± 0.001	1.099 ± 0.343	11.7 ± 4.71
Ac. grasos totales	12.06 ± 1.00	0.0031 ± 0.001	1.208 ± 0.212	13.2 ± 2.43
Hexánico	13.61 ± 0.96	0.0033 ± 0.001	1.520 ± 0.113 **	12.8 ± 2.32

** $P < 0.01$, comparado con el control. a : Datos promedios ± desviación estándar

Tabla 4. Efecto de los tratamientos sobre peso, diámetro de ovarios y número de folículos secundarios a 16 días.^a

Tratamientos	Peso corporal (g)	Peso ovarios (g)	Diámetro ovarios (mm)	Número folículos
Esteroles totales	16.04 ± 1.59	0.0033 ± 0.0014	1.270 ± 0.353	17.7 ± 4.40 *
Etanólico	17.09 ± 2.62	0.0033 ± 0.0005	1.322 ± 0.216	12.1 ± 2.17
Control	17.06 ± 1.34	0.0040 ± 0.0011	1.377 ± 0.168	12.7 ± 2.12
Ac. grasos totales	17.0 ± 2.02	0.0034 ± 0.0006	1.266 ± 0.203	10.5 ± 1.50 *
Hexánico	16.61 ± 1.06	0.0020 ± 0.0007 *	0.936 ± 0.199 **	14.2 ± 3.91

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con el control. a : Datos promedios ± desviación estándar